

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-271430

(43)Date of publication of application : 18.10.1996

(51)Int.Cl.

G01N 21/78  
C09B 11/28  
C09K 11/06  
G01N 21/64  
// C07D311/78

(21)Application number : 07-070077

(71)Applicant : AISIN SEIKI CO LTD

(22)Date of filing : 28.03.1995

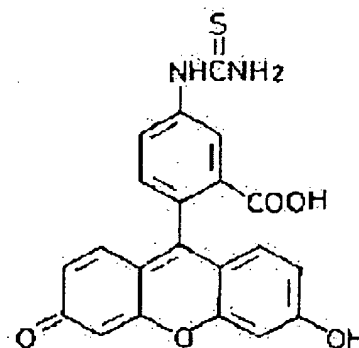
(72)Inventor : FUJITA SATOSHI  
KAGIYAMA NAOTO  
MOMIYAMA MASAYOSHI  
KONDO YASUMITSU

## (54) NOVEL FLUORESCENT DYE

## (57)Abstract:

PURPOSE: To provide novel fluorescent dye having fluorescent intensity higher than that of fluorescent dye currently employed by synthesizing a novel fluorescent dye of fluorescent compound of fluorecein derivative represented by a specified chemical structural formula.

CONSTITUTION: An antibody is labeled directly with a fluorescent dye and caused to react on a specimen, i.e., a protein or nucleic acid, and irradiated with exciting light to emit fluorescence which is detected by FIA method in order to detect a specimen. In this regard, a novel fluorescent dye of fluorescent compound of fluorecein derivative represented by the formula is employed. The novel fluorescent dye has fluorescent intensity higher than that of fluorescent dye currently employed in FIA method. Consequently, a novel fluorescent dye having fluorescent intensity higher than that of fluorescent dye currently employed can be obtained.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-271430

(43)公開日 平成8年(1996)10月18日

(51)Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 21/78			G 0 1 N 21/78	C
C 0 9 B 11/28			C 0 9 B 11/28	J
C 0 9 K 11/06		9280-4H	C 0 9 K 11/06	Z
G 0 1 N 21/64			G 0 1 N 21/64	Z
// C 0 7 D 311/78			C 0 7 D 311/78	
審査請求 未請求 請求項の数1 O L (全 8 頁)				

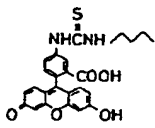
(21)出願番号	特願平7-70077	(71)出願人	000000011 アイシン精機株式会社 愛知県刈谷市朝日町2丁目1番地
(22)出願日	平成7年(1995)3月28日	(72)発明者	藤 田 聡 愛知県刈谷市朝日町2丁目1番地 アイシン精機株式会社内
		(72)発明者	鍵 山 直 人 愛知県刈谷市朝日町2丁目1番地 アイシン精機株式会社内
		(72)発明者	初 山 政 慶 愛知県刈谷市朝日町2丁目1番地 アイシン精機株式会社内
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 新規蛍光色素

## (57)【要約】

【目的】 現在FIA (fluorescein immuno assay) 法に用いられている蛍光色素以上の蛍光強度を有する新規蛍光色素を提供すること。

【構成】 蛍光色素を直接抗体等に標識し、該抗体を被検体であるタンパク質や核酸等に反応させ、励起光の照射で発生する蛍光で前記被検体を検出するFIA (fluorescein immuno assay) 法の前記蛍光色素において、下記の化学構造式で表されるフルオレセイン誘導体の蛍光化合物の新規蛍光色素。

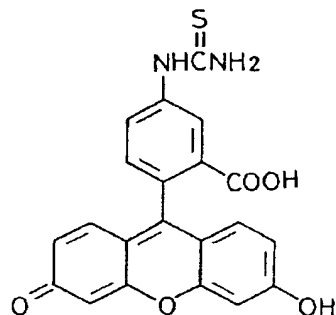
フルオレセイン誘導体	FITCに対する相対蛍光強度
	1.4 倍

1

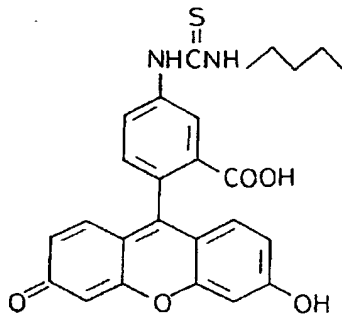
## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 蛍光色素を直接抗体等に標識し、該抗体を被検体であるタンパク質や核酸等に反応させ、励起光の照射で発生する蛍光で前記被検体を検出するFIA (fluorescein immuno assay) 法の前記蛍光色素において、下記の化学構造式で表されるフルオレセイン誘導体の蛍光化合物の新規蛍光色素。

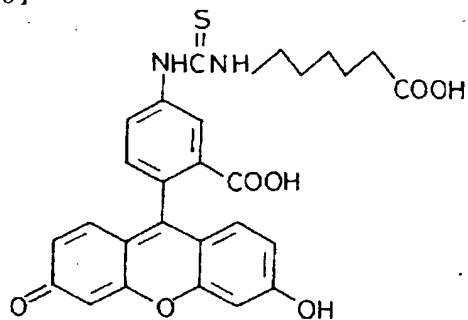
【化1】



【化2】

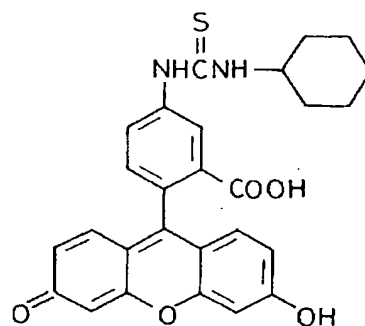


【化3】



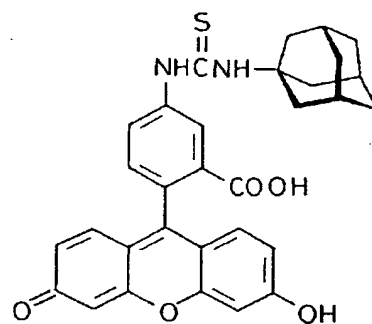
【化4】

2



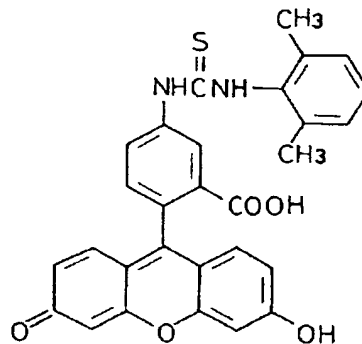
10

【化5】



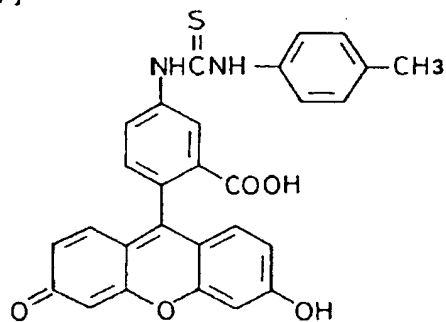
20

【化6】



30

【化7】



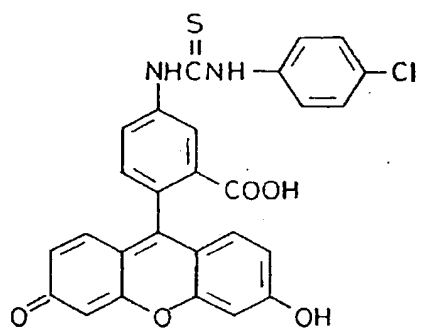
40

【化8】

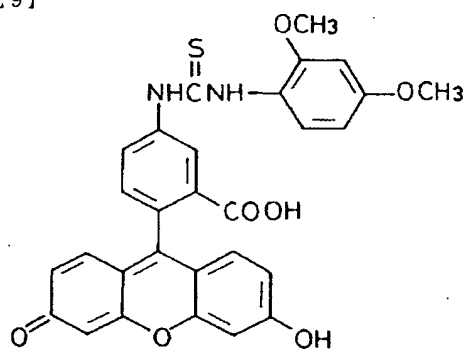
(3)

特開平8-271430

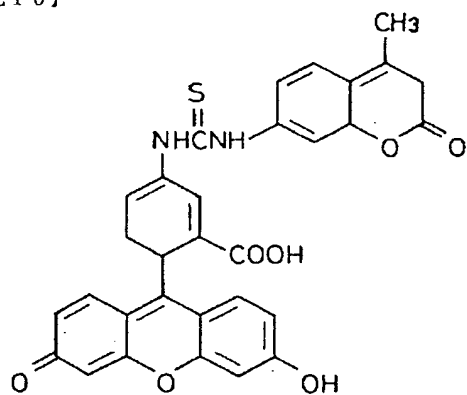
3



【化9】

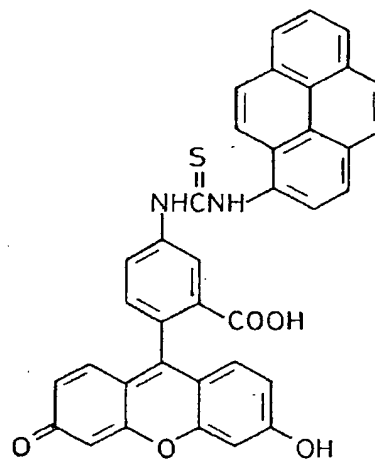


【化10】

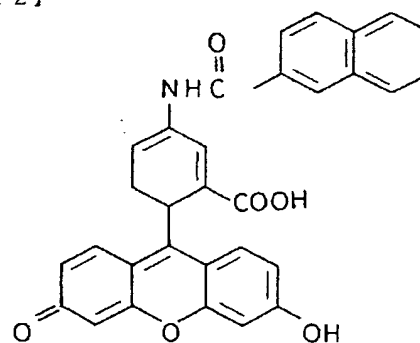


【化11】

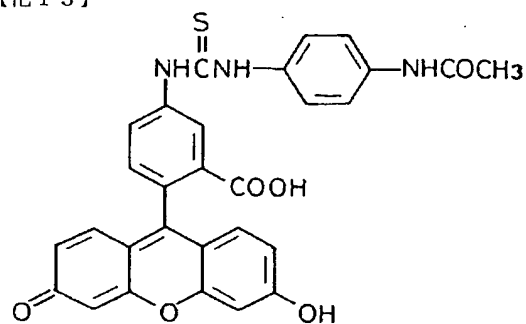
4



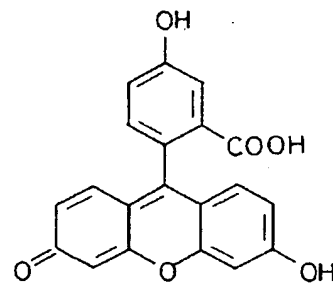
【化12】



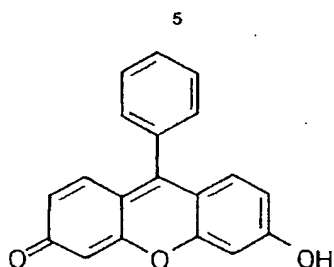
【化13】



【化14】



【化15】



## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、タンパク質や核酸等の検定方法である、蛍光色素を直接抗体等に標識する F I A (fluorescein immuno assay) 法の蛍光色素に関する。

【0002】

【従来の技術】現在の臨床検査は、血中のタンパク質を検査することが大半を占めている。検査方法としては、酵素を用いる FEIA (fluorescein enzyme immunosorbent assay) 法が主流を占めている。しかしながら、FEIA法は酵素を用いるために作業工程が複雑となり時間もかかるため、大量処理を行う臨床分野で不向きな方法である。

【0003】現在、市場では、酵素を用いない、蛍光色素を直接抗体等に標識する F I A (fluorescein immuno assay) 法が望まれている。

【0004】F I A法に用いられる蛍光色素としては、ベーリンガー・マンハイム (Boehringer Mannheim) 社の fluorescein-12-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate (fluorescein-12-dUTP) 等が知られている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、現在 F I A法に用いられる蛍光色素のどれもが、蛍光強度が不足しており、従って、検定が困難なため、現在において F I A法は確立したものとはなっていない。

【0006】F I A法を確立する一要因としては、現在用いられている蛍光色素以上の蛍光強度を有する蛍光色素が必要である。

【0007】本発明は、現在用いられている蛍光色素以上の蛍光強度を有する新規蛍光色素を提供することを、その技術的課題とするものである。

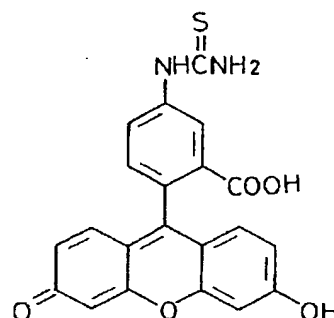
【0008】

【課題を解決するための手段】上記技術的課題を解決するために、本発明は、蛍光色素を直接抗体等に標識し、該抗体を被検体であるタンパク質や核酸等に反応させ、励起光の照射で発生する蛍光で前記被検体を検出する F I A (fluorescein immuno assay) 法の前記蛍光色素において、下記の化学構造式で表されるフルオレセイン誘導体の蛍光化合物の新規蛍光色素を合成した。

6

【0009】

【化1】

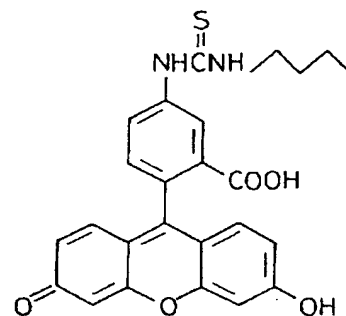


【0010】N-フルオレセインチオウレア

N-Fluorescein thiourea

【0011】

【化2】

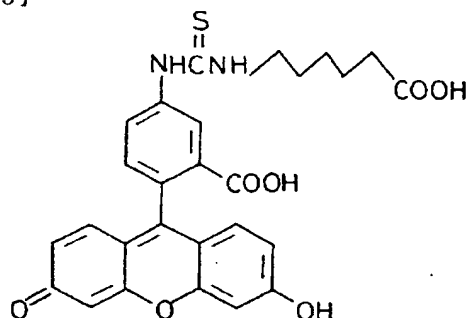


【0012】N-(5-ブチル)-N'-(4-フルオレセイン)チオウレア

N-(5-Butyl)-N'-(4-fluorescein) thiourea

【0013】

【化3】

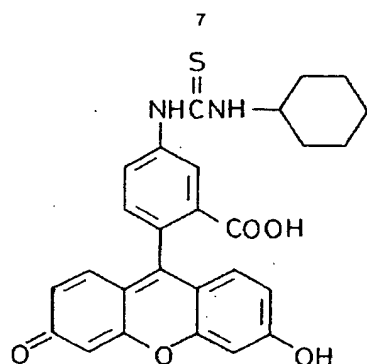


【0014】1-(4-フルオレセインチオウレイド)-6-ヘキサン酸

1-(4-Fluoresceinthioureido)-6-hexanoic acid

【0015】

【化4】

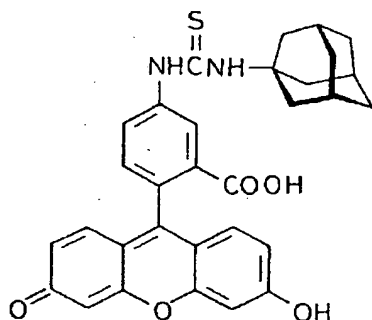


【0016】 N-シクロヘキシル-N'-(4-フルオ  
レセイン) チオウレア

N-(Cyclohexyl)-N'-(4-flu  
orescein) thiourea

【0017】

【化5】

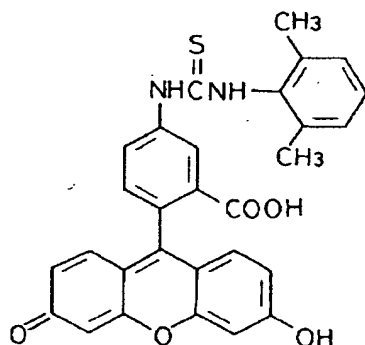


【0018】 1-アダマンチルフルオレセインチオウレ  
ア

1-Adamanthylfluorescein t  
hiourea

【0019】

【化6】

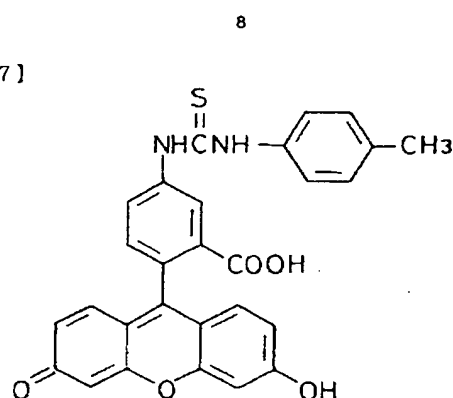


【0020】 2, 6-ジメチルフェニルフルオレセイン  
チオウレア

2, 6-Dimethylphenylfluores  
cein thiourea

【0021】

【化7】

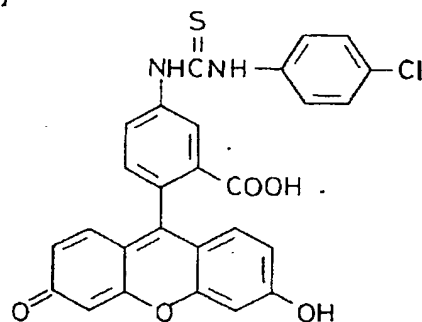


【0022】 4-メチルフェニルフルオレセインチオウ  
レア

4-Methylphenylfluorescein  
thiourea

【0023】

【化8】

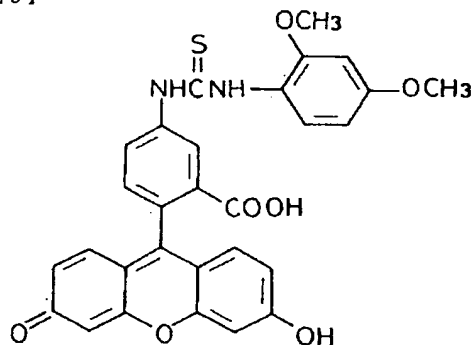


【0024】 N-(p-クロロフェニル)-N'-(4-  
フルオレセイン) チオウレア

N-(p-Chlorophenyl)-N'-(4-  
fluorescein) thiourea

【0025】

【化9】



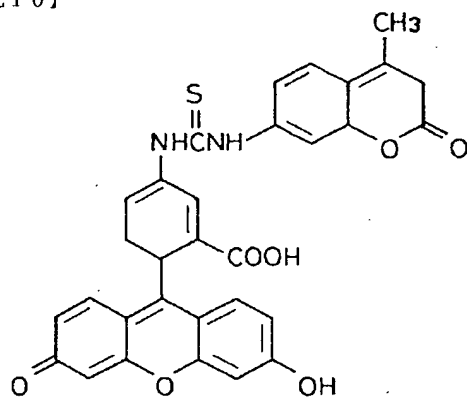
【0026】 2, 4-ジメトキシフェニルフルオレセイ  
ンチオウレア

2, 4-Dimethoxyphenylfluore  
scein thiourea

9

【0027】

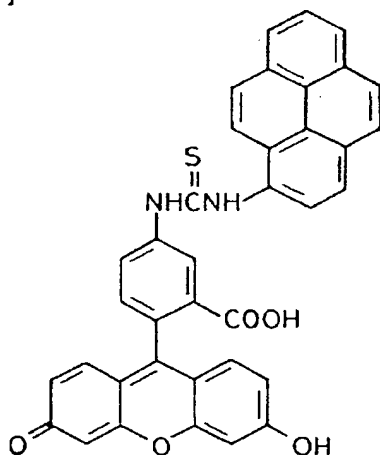
【化10】



【0028】N-〔7-(4-メチルクマリン)〕-  
N'-(4-フルオレsein)チオウレア  
N-〔7-(4-Methylcoumarinyl)〕-N'-(4-fluorescein) thiourea

【0029】

【化11】



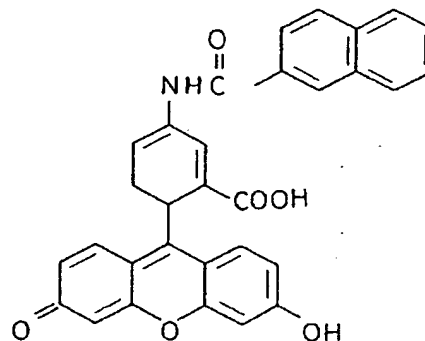
【0030】N-(1-ピレン)-N'-(4-フルオ  
レsein)チオウレア

N-(1-Pyrenyl)-N'-(4-fluor  
escein) thiourea

【0031】

【化12】

10

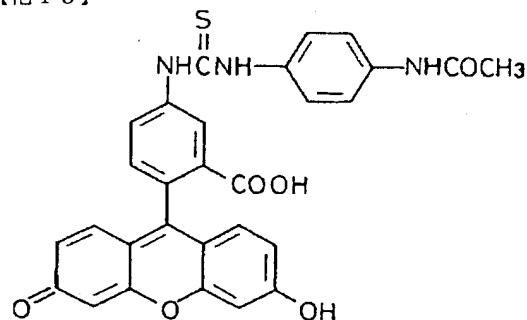


【0032】2-ナフチル-N'-(4-フルオレsein)  
チオウレア

2-Naphthyl-N'-(4-fluorescein) thiourea

【0033】

【化13】

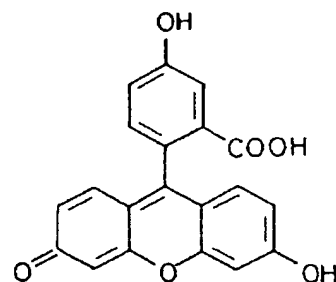


【0034】4-アセトアミドフェニルフルオレsein  
チオウレア

4-Acetamidophenylfluorescein thiourea

【0035】

【化14】



【0036】4-ヒドロキシフルオレsein

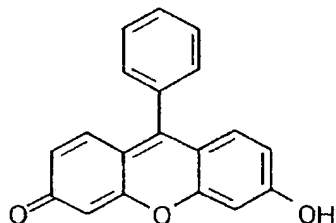
4-Hydroxyfluorescein

【0037】

【化15】



11



【0038】3-カルボニル-6-ヒドロキシ-9-フェニルキサントレン

3-Carbonyl-6-hydroxy-9-phenylxanthene

【0039】

【作用及び効果】本発明においては、上記の新規蛍光色素は、現在FIA法に用いられている蛍光色素に対して、より高い蛍光強度を有している。

【0040】従って、現在用いられている蛍光色素の蛍光強度以上の蛍光強度を有する新規蛍光色素を提供することを可能にしている。

【0041】

【実施例】

（実施例1）化学構造式（化2）で表される請求項1の新規蛍光色素を下記の方法により合成した。

【0042】先ず、30mlのナス型フラスコにフルオレセインイソチオシアナート（fluorescein isothiocyanate）311mg（0.08mmol：以下、FITCと称す。）を入れ、シーラムキャップでフラスコの口を閉じ、アルゴンガスをフラスコ内に吹き込み、アルゴン雰囲気化した。

【0043】次いで、フラスコにドライエタノール5mlを加え、懸濁させた。更に、n-ブチルアミン（n-Butylamine）86.8μl（0.88mmol）を加え、室温で5時間攪拌した。

【0044】TLCで原料スポットの消失を確認した後、反応液のエタノールを減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して、化学構造式（化2）

12

で表されるフルオレセイン誘導体の蛍光化合物の新規蛍光色素を収率93%で得た。

【0045】次に、新規蛍光色素の蛍光増感効果を下記の方法により確認した。

【0046】新規蛍光色素5mgをN,N,ジメチルホルムアミド（DMF）1mlに溶解し、新規蛍光色素が溶解したDMF溶液を1μg/mlの濃度になるようにpH=6.8の蒸留水2mlに加え、よく攪拌した。次いで、この溶液を、温度25℃で、溶液生成直後に蛍光分光高度計（島津RF-5000）で測定した（λ<sub>ex</sub>=490nm、λ<sub>em</sub>=512nm）。

【0047】比較対照用として、従来の蛍光色素の一つであるFITCの蛍光増感効果を下記の方法により確認した。

【0048】FITC5mgをDMF1mlに溶解し、FITCが溶解したDMF溶液を1μg/mlの濃度になるようにpH=6.8の蒸留水2mlに加え、よく攪拌した。次いで、この溶液を蛍光分光高度計（島津RF-5000）で測定した（λ<sub>ex</sub>=490nm、λ<sub>em</sub>=512nm）。

【0049】この蛍光増感効果の試験結果を図1に示す。図1から分かるように、本実施例において得られた新規蛍光色素は、FITCに比べて高い蛍光強度を示した。

【0050】本実施例では、化学構造式（化2）で表されるフルオレセイン誘導体の蛍光化合物の新規蛍光色素を合成し、蛍光増感効果を確認したが、化学構造式（化1）、（化3）、（化4）、（化5）、（化6）、（化7）、（化8）、（化9）、（化10）、（化11）、（化12）、（化13）、（化14）、（化15）で表されるフルオレセイン誘導体の蛍光化合物の新規蛍光色素においても同様の作用効果が得られる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本実施例の蛍光増感効果試験の結果を示す図。

【図1】

フルオレセイン誘導体	FITCに対する相対蛍光強度
	1.4 倍

フロントページの続き

(72)発明者 近 藤 恭 光

愛知県刈谷市朝日町 2 丁目 1 番地 アイシ  
ン精機株式会社内